

棉铃虫感染中华卵索线虫后血淋巴酚氧化酶活性的变化及其分离纯化

李志强^{1,2,3}, 王茂先¹, 袁均林¹, 陈国生^{1,*}

(1. 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 研究了中华卵索线虫 *Ovomermis sinensis* 感染棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫后宿主体内酚氧化酶活性的变化。研究结果表明, 在感染后的第 1 天, 中华卵索线虫的侵入引起酚氧化酶活性的增加, 感染组酶活性是同期对照组的 1.12 倍; 但在随后的寄生期间, 中华卵索线虫抑制了宿主的酚氧化酶活性, 其中以第 5 天的抑制最为强烈: 同期对照组酶活性是感染组的 1.52 倍。对酚氧化酶进行了初步的分离纯化, 纯化倍数为 41.5 倍, 酶得率为 12.7%, 比活力为 4 030.6 U/mg。

关键词: 棉铃虫; 中华卵索线虫; 酚氧化酶; 血淋巴; 纯化

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)06-0878-04

Activity changes of phenoloxidase in haemolymph of *Helicoverpa armigera* parasitized by *Ovomermis sinensis* and its purification

LI Zhi-Qiang^{1,2,3}, WANG Mao-Xian¹, YUAN Jun-Lin¹, CHEN Guo-Sheng^{1,*} (1. College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The activity changes of phenoloxidase in haemolymph of *Helicoverpa armigera* larvae parasitized by *Ovomermis sinensis* were investigated. The results showed that on the first day of infection, the phenoloxidase activity of the infected group increased, which was 1.12 times that of the control group; but in the latter time of infection, the phenoloxidase activity of the infected group was inhibited by the nematodes. On the fifth day of infection, the inhibition reached the highest degree, and the phenoloxidase activity of control group was 1.52 times that of the infected group. Purified with 40% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and Sephadex G-200 gel filtration from the crude enzyme, the phenoloxidase with the purification factor of 41.5, the yield factor of 12.7% and the specific activity of 4 030.6 U/mg was obtained.

Key words: *Helicoverpa armigera*; *Ovomermis sinensis*; phenoloxidase; haemolymph; purification

棉铃虫是一种重要的农作物害虫, 给世界各国带来了巨大的经济损失。棉铃虫和其他昆虫一样, 具有不同于高等脊椎动物的独特的免疫系统。在昆虫的免疫系统中, 酚氧化酶(phenoloxidase, PO)起着重要的作用。酚氧化酶, 又称为酪氨酸酶(EC1.10.3.1), 是一种含铜离子的氧化酶, 可根据其氧化底物的不同, 将其分为单酚氧化酶和双酚氧

化酶。在节肢动物中, 酚氧化酶所催化的黑色素的合成在外骨骼骨化、伤口愈合以及免疫防卫反应(形成结节及包囊)中均起着重要作用(Michael *et al.*, 2000; 时超美, 2000)。

中华卵索线虫 *Ovomermis sinensis* 是昆虫寄生线虫的一种, 它可寄生于鳞翅目多种昆虫的幼虫体内, 是一种常见的虫生线虫, 可主动寻找宿主、繁殖力

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170129)

作者简介: 李志强, 男, 1979 年生, 湖北石首人, 博士研究生, E-mail: brucelemon@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence

收稿日期 Received: 2005-12-15; 接受日期 Accepted: 2006-05-15

强、专性寄生、寄生率等于宿主的死亡率,并具有资源丰富、不污染环境和宿主不易产生抗药性等优点,对人畜及环境安全无毒(鲍学纯,1996)。中华卵索线虫作为一种生物防治材料,无疑具有广泛的应用前景和重大的科学意义。高原等(1998,2004)研究了中华卵索线虫的生活史以及雌、雄线虫可溶性蛋白的差异;王茂先等(2004,2005)研究了线虫感染宿主后宿主血淋巴成分的变化。本实验对中华卵索线虫感染棉铃虫幼虫后宿主体内酚氧化酶活性的变化进行了研究,旨在探讨棉铃虫幼虫被外来物感染后的免疫生理反应;并初步分离纯化了酚氧化酶。

1 材料与方法

1.1 材料

中华卵索线虫在本实验室于室温(26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 通过体内培养进行传代。把传代所得怀卵雌虫置于24孔板中,让其产卵并孵化出感染期幼虫,贮于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内备用。

棉铃虫卵由湖北省农业科学院 Bt 研究开发中心提供,室内(28 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵化,人工饲养棉铃虫,依据其头壳宽度来鉴别其龄期,饲养至3~4龄备用。

L-DOPA 为美国 Sigma 公司产品, Sephadex G-200 为瑞典 Pharmacia 公司产品。其他试剂均为分析纯级的。

1.2 方法

1.2.1 感染和未感染中华卵索线虫的棉铃虫血淋巴酚氧化酶活性的测定:用中华卵索线虫 II 期幼虫于室内(28 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下感染4龄的棉铃虫幼虫,感染比例为28:1,感染时间为4 h。在感染的同时随机选取棉铃虫幼虫20头,在4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻15 min后,剪去腹足,取血淋巴,放入置于冰上的 Eppendorf 管中,混匀后,再从其中取出50 μL 血淋巴加入到200 μL AC 缓冲液(62 mmol/L NaCl,100 mmol/L 葡萄糖,10 mmol/L EDTA,30 mmol/L 柠檬酸三钠,26 mmol/L 柠檬酸,pH 4.6)中,立即放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存。在感染后的第1、2、3、4、5、6、7天对照组按上述方法取血淋巴。感染组的血淋巴采集则随机选取棉铃虫,每1头棉铃虫的血淋巴放入一个置于冰上的 Eppendorf 管中;取样完毕,立即解剖棉铃虫,确定其有无中华卵索线虫寄生,若无中华卵索线虫寄生,则需再随机挑选棉铃虫,以使感染组的20头棉铃虫幼虫都被中华卵索线虫寄生。所取血淋巴也按上述处

理血淋巴的方法进行处理。测定酚氧化酶活性时,从-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中取出血淋巴样品,解冻后,4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 r/min 离心10 min,取上清液。取140 μL 50 mmol/L PBS,pH 7.0,20 μL 上清液和140 μL 20 mmol/L L-DOPA(用双蒸水溶解),依次加入96孔酶标板中,立即混匀,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应5 min后用酶标仪测定 OD₄₉₀ 值,以加 AC 缓冲液的作为对照。在上述条件下,使吸光度值每分钟增加0.001所需要的酶量为一个活力单位 U(尹丽红等,2001;Pilar *et al.*,2001)。实验重复3次,取其平均值。

1.2.2 血淋巴酚氧化酶的分离纯化:未感染中华卵索线虫的棉铃虫幼虫饲养到4至5龄,在冰上的1.5 mL 的 Eppendorf 管中预先加入500 μL 的 AC 缓冲液,棉铃虫幼虫在4 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻15 min后,自腹足处取血淋巴放入 Eppendorf 管中,直至1 000 μL 左右,立即放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存。提取酶液时,解冻,4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 r/min 离心10 min,取上清液,即为粗酶液。由于血淋巴含有较多的杂蛋白,故先加固体硫酸铵粉末到粗酶液中,使其饱和度达到40%,在4 $^{\circ}\text{C}$ 静置20 min后,4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 r/min 离心10 min,取沉淀,溶于少量的 AC 缓冲液中,并在相同缓冲液中透析24 h,其间更换2~4次透析液。浓缩后上样于用洗脱缓冲液充分平衡过的 Sephadex G-200 凝胶过滤柱(50 cm \times 1 cm),进行分子排阻层析,洗脱缓冲液为0.05 mol/L Tris-HCl,0.25 mol/L NaCl,pH 7.2,流速控制在2 mL/10 min,每2 mL 收集一管。洗脱完毕,立即用0.02 mol/L L-DOPA 对分部收集的组分进行酶活性测定,合并具有高酶活性的组分,作为 Sephadex G-200 纯化的样品并置-20 $^{\circ}\text{C}$ 下备用。

在纯化过程中,酶活性的测定采用1.2.1节的方法。蛋白质含量的测定采用 Lowry 法。计算纯化倍数、得率和比活力等。

2 结果与分析

2.1 感染和未感染中华卵索线虫的棉铃虫幼虫血淋巴酚氧化酶活性的变化

感染组和对照组酶活性变化如图1所示。由图1可以看出,感染组在第1天酚氧化酶活性有轻微的上升,是对照组酶活性的1.12倍;第3、4、5天是对照组酶活性的快速增长期,第5天酶活性达到最高峰,是同期感染组的1.52倍;在第6天和第7天呈下降的趋势,但下降幅度不大。感染后第1天感染组酶活性比对照组要高;第2、3、4、5天酶活性变

化不大,均低于第 1 天的酶活性;最后两天酶活性有所增高,但均低于同期对照组。

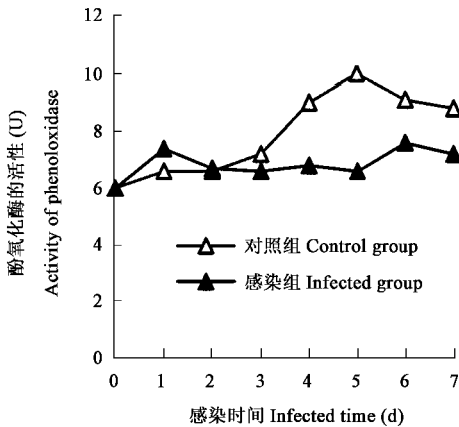


图 1 棉铃虫幼虫血淋巴酚氧化酶活性变化
Fig.1 Activity changes of phenoloxidase in the haemolymph of *Helicoverpa armigera* larvae

2.2 血淋巴酚氧化酶分离纯化结果

酚氧化酶纯化结果见表 1。经两步纯化后,酚氧化酶纯化倍数为 41.5,产率为 12.7%,比活力为

4 030.6 U/mg。

3 讨论

对中华卵索线虫寄生于棉铃虫后宿主免疫反应的研究,仅见于陈伍国等(2002)报道,但并没有研究酚氧化酶。我们通过实验研究了棉铃虫被中华卵索线虫寄生后酚氧化酶活性的变化,发现棉铃虫被中华卵索线虫寄生后的第 1 天酚氧化酶的活性比对照组高,随后都比对照组低;而对照组酚氧化酶的活性在第 5 天达最高。寄生的第 1 天是中华卵索线虫侵入棉铃虫的初期,在这个时期,可能是因为中华卵索线虫的侵入刺激了棉铃虫的免疫系统,使其酚氧化酶活性增高,这个时期对线虫来说可能是其在寄主体内能否存活的关键时期;随后的寄生期,中华卵索线虫对寄主产生了免疫抑制,从而使自己能正常生长发育。程振衡等(1990)对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 血淋巴的酚氧化酶进行了研究,发现 4 龄幼虫后期,血淋巴中的酚氧化酶活性最高,蜕皮后迅速下降,然后随 5 龄幼虫的生长,酚氧化酶活

表 1 棉铃虫幼虫血淋巴酚氧化酶纯化结果
Table 1 Purification of phenoloxidase in the haemolymph of *Helicoverpa armigera* larvae

纯化步骤 Steps	总活力(U) Total activity	蛋白含量(mg) Total protein	比活力(U/mg) Special activity	产率(%) Recovery	纯化倍数 Purification factor
粗酶液 Crude enzyme	15 600	160.65	97.1	100	1
40% 硫酸铵沉淀 Saturated with (NH ₄) ₂ SO ₄	858	14.70	58.4	5.5	0.6
Sephadex G-200	1 975	0.49	4 030.6	12.7	41.5

性逐渐升高,到 5 龄第 7 天,其活性又达最高值。本实验结果表明,对照组第 3 天活性开始增高,第 5 天达到高峰,与程振衡等(1990)的研究结果类似。感染组到第 6 天,活性才达到高峰,这种结果的出现与中华卵索线虫寄生棉铃虫后,引起棉铃虫发育受阻有关;4 龄对照组棉铃虫于实验的第 6 天达蜕皮高峰,以后进入 5 龄发育阶段。实验后两天测得的酚氧化酶活性降低可能与棉铃虫处于 5 龄早期有关。而感染组由于中华卵索线虫的寄生而使宿主的发育受阻,蜕皮的时间推后,所以酶活性上升的时间推后。徐文岳等(2001)对约氏疟原虫寄生大劣按蚊后的酚氧化酶活性的变化做了一番研究,结果与本实验结果相反,发现感染组的血淋巴酚氧化酶活性明显高于吸正常血组,但是随着约氏疟原虫卵囊黑化比率的增高,感染组酚氧化酶活性逐渐下降。本实

验中,发现中华卵索线虫寄生于棉铃虫后,抑制了寄主的酚氧化酶活性,从而逃脱了被黑化包被的命运,成功寄生于棉铃虫。中华卵索线虫寄生于棉铃虫后随后进行解剖,尚未发现有黑化包被现象。至于中华卵索线虫通过何种途径来抑制寄主的酚氧化酶活性,则有待进一步研究。

我们采用 40% 饱和度的硫酸铵沉淀, Sephadex G-200 凝胶过滤层析对棉铃虫血淋巴酚氧化酶进行纯化,经两步纯化后,酚氧化酶活力提高了 41.5 倍。目前,国内有关昆虫酚氧化酶纯化的报道仅见于刘春英等(2004)以及程振衡和梁子才(1990)等报道,纯化倍数分别为 6.96 和 56。Tsunaki 等(2001)分离纯化了家蚕表皮和血淋巴中的酚氧化酶,均得到纯酶:表皮中有两种酚氧化酶的同工酶, PAGE 时处的位置不同,但很接近;血淋巴中也有两种酚氧化酶

的同工酶,分别与表皮中两种酚氧化酶具有同样的电泳性质。Petr 等(1995)分离纯化了大蜡螟 *Galleria mellonella* 血淋巴中的酚氧化酶,比活力提高了 136 倍。在凝胶过滤这一步,酶活性有所恢复。Michael 等(2000)在分离纯化 *Sarcophaga bullata* 血淋巴酚氧化酶的实验中,曾发现有这种现象。他们认为出现这种现象是由于蛋白质浓度太高及有蛋白质干扰醌代谢的缘故。郑校先等(2001)在分离纯化乌贼墨中多酚氧化酶的实验中,也发现酶总活力有增加的现象。本实验中,可能在硫酸铵沉淀这一步带来了对酶的活性有抑制的物质,在进行 Sephadex G-200 柱层析时,去除了这些抑制物质,从而使酶活力部分恢复。

参 考 文 献(References)

Bao XC, 1996. Insect Nematology. Wuhan: Wuhan University Press. 15 – 99. [鲍学纯, 1996. 昆虫线虫学. 武汉: 武汉大学出版社. 15 – 99]

Chen WG, Luo QG, Wang D, Gao Y, 2002. Study on haemolymph pathology of *Helicoverpa armigera* infected by *Ovomermis sinensis*. *Journal of Central China Normal University* (Nat. Sci.), 36(3): 349 – 352. [陈伍国, 路启桂, 王丹, 高原, 2002. 中华卵索线虫感染棉铃虫后的血淋巴病理学研究. 华中师范大学学报(自然科学版), 36(3): 349 – 352]

Cheng ZH, Liang ZC, 1990. Studies on the phenoloxidase in the hemolymph of the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis*. *Acta Entomol. Sin.*, 33 (4): 424 – 429. [程振衡, 梁子才, 1990. 亚洲玉米螟血淋巴中酚氧化酶的研究. 昆虫学报, 33(4): 424 – 429]

Gao Y, Wang GX, Chen SL, 2004. Preliminary analysis on dissoluble protein of *Ovomermis sinensis* adults by 2-D PAGE. *Acta Zoologica Sinica*, 51(1): 141 – 144. [高原, 王国秀, 陈思礼, 2004. 中华卵索线虫雌雄成虫可溶性蛋白双向电泳分析. 动物学报, 51(1): 141 – 144]

Gao Y, Wu F, Cheng DD, 1998. A preliminary study on the life cycle of *Ovomermis sinensis*. *Journal of Central China Normal University* (Natural Science), Special Issue: 52 – 56. [高原, 吴芳, 程丹丹, 1998. 中华卵索线虫生活史的初步研究. 华中师范大学学报(自然科学版), 专辑: 52 – 56]

Liu CY, Luo WC, Li FZ, Wang XY, 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Semiothisa cinerearia* Bremer et Grey (Lepidoptera: Geometridae). *Acta Entomol. Sin.*, 47(2): 184 – 188. [刘春英, 罗万春, 李方正, 王晓云, 2004. 槐尺蠖多酚氧化酶的纯化及酶学特征. 昆虫学报, 47(2): 184 – 188]

Michael RC, Kiran R, James B, Manickam S, 2000. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(10): 953 – 967.

Petr K, Christoph W, Peter G, 1995. The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(10): 1 081 – 1 091.

Pilar M, Adolfo A, Miriam PM, 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chem.*, 75: 317 – 324.

Shi CM, 2000. The activation of insect prophenoloxidase and its function in insect immunity. *Entomological Knowledge*, 37(5): 310 – 314. [时超美, 2000. 昆虫酚氧化酶原活化及其在免疫中的作用. 昆虫知识, 37(5): 310 – 314]

Tsunaki A, Masaaki A, 2001. Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 276(14): 11 100 – 11 112.

Wang MX, Li Y, Wang GX, 2005. Changes in the contents of reducing sugar, trehalose and free fatty acids in the haemolymph *Helicoverpa armigera* infected by *Ovomermis sinensis*. *Acta Zoologica Sinica*, 51 (2): 280 – 285. [王茂先, 李扬, 王国秀, 2005. 棉铃虫被中华卵索线虫感染后血淋巴中还原糖、海藻糖和游离脂肪酸的变化. 动物学报, 51(2): 280 – 285]

Wang MX, Wang GX, Li ZQ, Li Y, Yang HL, 2004. Change in the content of free amino acids in haemolymph of *Helicoverpa armigera* infected by *Ovomermis sinensis* (Nematode). *Acta Entomol. Sin.*, 47(2): 277 – 280. [王茂先, 王国秀, 李志强, 李扬, 杨红丽, 2004. 棉铃虫感染中华卵索线虫后血淋巴游离氨基酸含量的变化. 昆虫学报, 47 (2): 277 – 280]

Xu WY, Huang FS, Zhang XL, Kuang MS, Duan JH, 2001. Relationship between hemolymph phenol oxidase and melanization of *Plasmodium yoelii* oocysts in *Anopheles dirus*. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 23(4): 440 – 442. [徐文岳, 黄复生, 张锡林, 况明书, 段建华, 2001. 大劣按蚊血淋巴酚氧化酶与约氏疟原虫卵囊黑化关系的研究. 第三军医大学学报, 23(4): 440 – 442]

Yin LH, Wang CZ, Qin JD, 2001. Micro-assay of phenoloxidase activity in *Helicoverpa armigera* haemolymph. *Entomological Knowledge*, 38(2): 119 – 122. [尹丽红, 王琛柱, 钦俊德, 2001. 棉铃虫血淋巴酚氧化酶活性的微量测定. 昆虫知识, 38(2): 119 – 122]

Zheng XX, Qi XY, Zhou PG, Jiang JJ, 2001. Purification of polyphenol oxidase from cuttlefish ink. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 10 (2): 154 – 157. [郑校先, 戚晓玉, 周培根, 江津津, 2001. 乌贼墨中多酚氧化酶的分离及纯化. 上海水产大学学报, 10(2): 154 – 157]

(责任编辑: 黄玲巧)